

ISBN 976-602-72006-3-0

BUKU 3

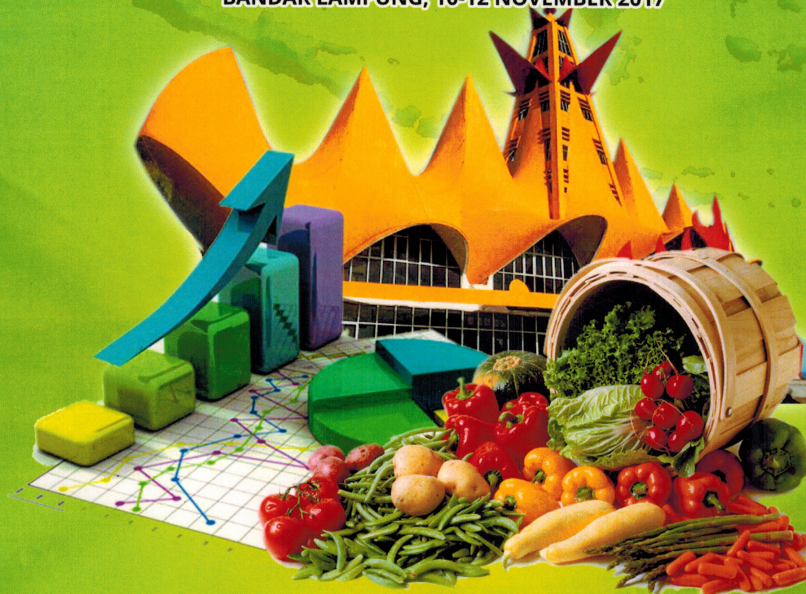
# PROSIDING

SEMINAR NASIONAL PATPI 2017



## **“Peran Ahli Teknologi Pangan Dalam Mewujudkan Ketahanan Pangan Nasional”**

Dalam Rangka  
Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Ahli Teknologi  
Pangan Indonesia (PATPI) dan Perayaan Ulang Tahun PATPI yang ke 50  
BANDAR LAMPUNG, 10-12 NOVEMBER 2017



Diselenggarakan Oleh:



Fakultas Pertanian  
Universitas Lampung



PATPI  
Cabang  
Lampung

Didukung Oleh:

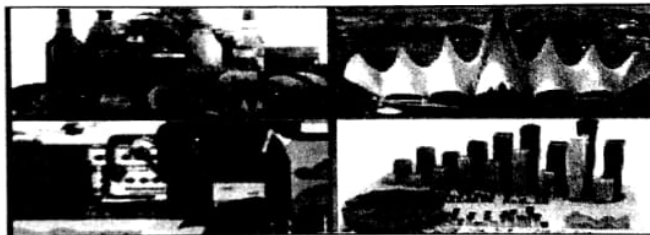


**PROSIDING**  
**SEMINAR NASIONAL PATPI 2017**  
**“PERAN AHLI TEKNOLOGI PANGAN DALAM**  
**MEWUJUDKAN KETAHANAN PANGAN NASIONAL”**

Dalam rangka  
Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan  
Indonesia (PATPI) dan Perayaan Ulang Tahun PATPI yang ke 50



**BANDAR LAMPUNG, 10-12 NOVEMBER 2017**



Diselenggarakan Oleh



**Fakultas Pertanian**  
**Universitas**  
**Lampung**



**PATPI**  
**Cabang**  
**Lampung**

Didukung oleh



**PROSIDING SEMINAR NASIONAL PATPI 2017**

**“PERAN AHLI TEKNOLOGI PANGAN DALAM MEWUJUDKAN  
KETAHANAN PANGAN NASIONAL”**

**Reviewer:**

Siti Nurdjanah, Ph.D

Dr. Sussi Astuti

Ribut Sugiharto, M.Sc

Dian Wulandari, M.Si

Pramita Sari Anungputri, M.Si

Prof. Dr. Ir. Tirza Hanum, M.S.

Samsu Udayana Nurdin, Ph.D.

**Sumber Gambar Cover:**

<http://infopedia.co.id/photo/infopedia-menara-siger.jpg>

[https://pbs.twimg.com/media/C7OVnYyV4AAhO\\_m.jpg](https://pbs.twimg.com/media/C7OVnYyV4AAhO_m.jpg)

<http://www.seratusinstitute.com/gambar/news/news-statistik-dan-statistika-78-l.jpg>

**Desain Grafis:**

Ardiyanto

**ISBN: 976-602-72006-3-0**

**Diterbitkan oleh:**

Fakultas Pertanian Universitas Lampung

Jln. Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145. Telp.  
(0721)704946. Fax. (0721)770347. Email: [dekanfp@unila.ac.id](mailto:dekanfp@unila.ac.id).

## DAFTAR ISI

KARAKTERISTIK FISIK DAN KIMIA TEXTURIZED VEGETABLE PROTEIN (TVP) DARI KORO PEDANG ( <i>Canavalia ensiformis</i> L.) Ahmad Nafi', Nur Sayidah, dan Triana Indriati .....	1115
EVALUASI MUTU FISIK DAN SENSORIS CUMI KERING DENGAN PERLAKUAN JENIS DAN LAMA PENGERINGAN Baiq Rien Handayani, Bambang Dipokusumo, Wiharyani Werdiningsih, Baiq Naila Nurul Wahida .....	1121
GAMBARAN DIVERSIFIKASI PRODUK DADIH YANG MENGANDUNG ANTI-OKSIDAN UNTUK PENINGKATAN KESEHATAN DAN EKONOMI MASYARAKAT (SEBUAH STUDI LITERATUR) Diah Kurnia Sari .....	1131
PENGARUH KONSUMSI TEPUNG UBI KELAPA TERMODIFIKASI ( <i>Dioscorea alata</i> ) TERHADAP PROFIL LIPID DARAH TIKUS HIPERKOLESTEROLEMIA Rosida, Purnawati, A and Susiloningsih, E.K. ....	1138
TINGKAT KESUKAAN DAN KARAKTERISTIK FISIKO-KIMIA ES KRIM SUSU KAMBING PERANAKAN ETAWA Erni Apriyati, Titiek F. Djaafar, Purwaningsih dan Tri Marwati.....	1145
FORTIFIKASI EKSTRAK DAUN KELOR ( <i>Moringa oleifera</i> L.) DALAM ROTI DAN BUBUR INSTAN Erni Rustiani, Mira Miranti, Fyga Monica, May Delvionita .....	1151
KARAKTERISTIK FISIK DAN KIMIA TEXTURIZED VEGETABLE PROTEIN (TVP) DARI KORO PEDANG ( <i>Canavalia ensiformis</i> L.) Ahmad Nafi, Nur Sayidah, Nurud Diniyya.....	1159
PENGEMBANGAN PROSES DAN PRODUK MIE SINGKONG MENGGUNAKAN MESIN PENGADUK DAN PENCETAK MIE, PROGRAM IbM-2014 Henny Krissetiana H, Sundari Setyaningsih and R. Sugiarto .....	1160
KAJIAN MUTU ORGANOLEPTIK MINUMAN SEGAR CORENS DENGAN PENGGUNAAN BERBAGAI JENIS JERUK I Ketut Budaraga, Yossi Oktavia, Leffy Hermalena .....	1167
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI INDIGENUS PADA TEPUNG JAGUNG ISI 16 SELAMA PROSES FERMENTASI SPONTAN Andi Sukainah, Eva Johannes, Reski Praja Putra .....	1176



## **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Indigenus pada Tepung Jagung Bisi 16 selama Proses Fermentasi Spontan**

### ***Isolation and Identification of Indigenous Bacteria on Corn Flour Bisi 16 during Spontaneous Fermentation Process***

**Andi Sukainah<sup>1)\*</sup>, Eva Johannes<sup>2)</sup>, Reski Praja Putra<sup>1)</sup>**

<sup>1)</sup> Program Studi Pendidikan Teknologi Pertanian, Fakultas Teknik, Universitas Negeri Makassar, Makassar, Indonesia

<sup>2)</sup> Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

\*Email Korespondensi : [andisukainah@yahoo.com](mailto:andisukainah@yahoo.com)

### **ABSTRACT**

*Indigenous microbes are a group of microbes that are involved and discovered during the spontaneous fermentation process of Corn flour Bisi 16. One type of bacteria involved and is found during the spontaneous fermentation process of corn flour Bisi 16 is lactic acid bacteria (LAB). However, apart from LAB, during the spontaneous fermentation process of corn flour Bisi 16 was also found another type of bacteria. The purpose of this study was to isolate and identify indigenous bacteria other than BAL involved in the spontaneous fermentation process of Corn flour Bisi 16. Isolate obtained from the isolation stage will be identified its morphological properties. The observed morphological properties are cell shape, Gram staining, catalase test, and endospore staining. Subsequently, pure isolates will be analyzed their genotypes using Polymerase Chain Reaction (PCR) method and 16S rRNA sequencing analysis. The results showed that ASN9 and ASN11 isolates obtained during the spontaneous fermentation process of corn meal had a white and round coloni shape. The ASN9 isolate on the edges of the colony is rather gummy. Both isolates have rod-shaped cells, Gram (-), catalase (+), and endospores (-). Results of the 16S rRNA sequencing analysis, both ASN9 and ASN11 isolates, showed both isolates were genotypically similar to the Enterobacter cloacae subsp. cloacae with a similarity rate of 98% (ASN9 isolates) and ASN11 isolates, ie 99%.*

**Keywords :** corn flour, spontaneous fermentation, isolation, identification, Enterobacter cloacae subsp. cloacae

### **ABSTRAK**

Mikroba indigenus adalah kelompok mikroba yang terlibat dan ditemukan selama proses fermentasi spontan tepung jagung Bisi 16. Salah satu jenis bakteri yang terlibat dan ditemukan selama proses fermentasi spontan tepung jagung Bisi 16 adalah bakteri asam laktat (BAL). Namun, selain BAL, selama proses fermentasi spontan tepung jagung Bisi 16 juga ditemukan jenis bakteri lain. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri indigenus selain BAL yang terlibat dalam proses fermentasi spontan tepung jagung Bisi 16. Isolat yang diperoleh dari tahap isolasi diidentifikasi sifat morfologinya. Sifat morfologi yang diamati adalah bentuk sel, pewarnaan Gram, uji katalase, dan pewarnaan endospora. Selanjutnya, isolat murni dianalisis sifat genotipnya menggunakan metode Polymerase Chain Reaction (PCR) dan analisis sekuensing 16S rRNA. Hasil penelitian

menunjukkan isolat ASN9 dan ASN11 yang diperoleh selama proses fermentasi spontan tepung jagung memiliki bentuk koloni bulat dan berwarna putih. Isolat ASN9 pada bagian tepi koloni agak berlendir. Kedua isolat memiliki sel yang berbentuk batang, Gram (-), katalase (+), dan endospora (-). Hasil analisis sekuensing 16S rRNA, baik isolat ASN9 maupun ASN11, menunjukkan kedua isolat memiliki kemiripan genotif dengan *Enterobacter cloacae subsp. cloacae* dengan tingkat kemiripan 98% (isolat ASN9) dan isolat ASN11, yaitu 99%.

**Kata Kunci :**tepung jagung, fermentasi spontan, isolasi, identifikasi, *Enterobacter cloacae subsp. cloacae*

## PENDAHULUAN

Pemanfaatan jagung menjadi produk pangan masih sangat rendah. Kondisi biji jagung yang keras dengan bentuk biji yang besar menyebabkan proses pengolahan memerlukan waktu yang lebih lama. Oleh karena itu, pengolahan jagung menjadi produk tepung jagung diperlukan. Jika dibandingkan dengan jagung berbentuk biji, tepung jagung akan lebih mudah diaplikasikan menjadi produk pangan, meskipun aplikasi tepung jagung sangat tergantung pada sifat fisiko kimianya.

Sifat fisikokimia adalah salah satu sifat yang berhubungan dengan viskositas dan gelatinisasi tepung jagung selama proses pemanasan, yaitu viskositas puncak dan viskositas pasta panas, dimana parameter ini menggambarkan kemampuan suatu granula mengalami pengembangan maksimal pada saat pemanasan (Zhang *et al.*, 2013). *Breakdown viscosity* atau perubahan pasta panas adalah sifat fisiko kimia yang menggambarkan ketahanan suatu granula terhadap proses pemanasan dan perlakuan mekanis selama proses pengolahan, sedangkan parameter viskositas pasta dingin dan *setback* adalah sifat fisiko kimia yang menggambarkan kemampuan granula melakukan retrogradasi selama pendinginan (Alvani *et al.*, 2012).

Tepung jagung sebagai pati alami masih memiliki viskositas gel yang tidak seragam, tidak tahan terhadap suhu tinggi, tidak tahan pada kondisi asam, tidak tahan

pada perlakuan mekanis, memiliki kelarutan yang terbatas, dan masih mudah mengalami sineresis. Hal ini menyebabkan aplikasi tepung jagung menjadi produk pangan masih sangat terbatas, sehingga diperlukan suatu usaha memodifikasi tepung jagung yang diharapkan dapat memodifikasi sifat fisik tepung jagung agar potensi aplikasinya menjadi lebih besar.

Modifikasi karakteristik tepung jagung dapat dilakukan dengan fermentasi. Modifikasi tepung dengan fermentasi sangat berpotensi untuk dikembangkan karena biaya operasional yang murah. Proses fermentasi didefinisikan sebagai penguraian pati oleh enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme pada suatu substrat, sehingga fermentasi pati jagung adalah penguraian pati jagung yang dilakukan oleh enzim amilase dan amiloglukooksidase yang dihasilkan oleh mikroba indigenus. Proses degradasi pati sangat tergantung pada komposisi amilosa dan amilopektin tepung jagung yang juga berpengaruh terhadap kinerja enzim, enzim amilase akan mendegradasi lebih banyak pati dengan kandungan amilosa tinggi (Shrestha *et al.*, 2012). Proses fermentasi jagung telah diteliti oleh Cui *et al.* (2012) yang melaporkan bahwa fermentasi tepung jagung dapat meningkatkan kandungan protein dan asam amino lisin yang selama ini menjadi faktor penghambat dari tepung jagung. Zeng *et al.* (2011) juga menemukan bahwa fermentasi jagung dapat menurunkan total asam dari jagung sehingga kualitas tepung jagung

menjadi lebih baik. Demikian halnya dengan penemuan Mohiedeen *et al.* (2010), yang menunjukkan bahwa proses fermentasi dapat meningkatkan globulin dan albumin dari tepung jagung.

Sukainah (2014) melaporkan hasil penelitian ketiga jenis tepung jagung (jagung BISI-2, pop dan srikandi) yang dimodifikasi menggunakan fermentasi spontan menyebabkan penurunan nilai viskositas puncak, viskositas balik, suhu awal dan suhu puncak serta nilai entalpi tepung jagung. Namun demikian, modifikasi tepung jagung menggunakan metode fermentasi secara spontan dianggap masih memiliki kelemahan yaitu jenis mikroba yang hidup dapat bervariasi dan sangat tergantung pada kondisi dan lingkungan sehingga sulit dikendalikan. Beberapa penelitian telah melaporkan bakteri dominan yang terlibat selama proses fermentasi spontan tepung jagung adalah dari golongan bakteri asam laktat (BAL). Bakteri asam laktat adalah jenis bakteri yang bersifat menguntungkan dalam proses fermentasi dan selalu terlibat dalam fermentasi secara spontan karena bersifat indigenus. Bakteri asam laktat mampu menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri patogen dan pembusuk disebabkan bakteri ini mampu menghasilkan beberapa senyawa anti bakteri seperti bakteriosin, hidrogen peroksida, asam lemak, reuterin, diasetil dan asam laktat.

Kajian penelitian mengenai keterlibatan bakteri indigenus lain, selain BAL, selama proses fermentasi spontan tepung jagung masih jarang dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini lebih fokus pada kajian keterlibatan bakteri indigenus lain yang mungkin terlibat selama proses fermentasi spontan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri indigenus selain BAL yang terlibat dalam proses fermentasi spontan tepung jagung Bisi 16.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan utama adalah jagung hibrida Bisi 16 yang diperoleh dari Kabupaten Jeneponto, Sulawesi Selatan. Media pertumbuhan mikroba yang digunakan adalah media PCA, media NA, dan media MRSA. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis adalah air dan akuades, NaCl, etanol 95%, minyak imersi, larutan kristal violet, alkohol 70%, spirtus, kapas, aluminium foil dan larutan safranin.

Peralatan yang digunakan untuk analisis meliputi blender, tabung reaksi, rak tabung sentrifus, vorteks, *hot plate*, *beaker glass*, labu ukur, penjepit (gegep), timbangan analitik, gelas ukur, *pipet volumetric*, pipet tetes, PCR (*polymerase chain reaction*), pH meter, *waterbath*, Erlenmeyer, cawan petri, inkubator, autoklaf, buret, mesin *disc mill* tipe 9FZ-23 dan mesin penyosoh biji jagung tipe PPK N 70.

### Metode Penelitian

#### Isolasi dan Identifikasi Bakteri Indigenus

Biji jagung yang telah dibersihkan dari kotoran dan biji cacat direndam selama 1 jam pada suhu ruangan dengan perbandingan jagung dan jumlah air 1 : 2 (b/v). Selanjutnya, penyosohan biji jagung dilakukan dengan menggunakan mesin penyosoh tipe PPK N 70. Beras jagung yang telah disosoh ditambahkan air yang telah dimasak dengan perbandingan 1 : 2 (b/v) difermentasi secara spontan selama 48 jam menggunakan metode mikroaerofilik. Selama proses fermentasi, cairan fermentasi diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan PCA, NA, dan MRSA. Inokulasi dan analisis dilakukan pada waktu fermentasi 24 dan 48 jam.

Bakteri indigenus pada media PCA, NA, dan MRSA diisolasi menggunakan

teknik goresan kuadran. Setelah diperoleh isolat dengan koloni terpisah dilakukan identifikasi sederhana yang terdiri dari tipikal koloni, bentuk morfologi (kokus atau batang), uji pewarnaan Gram (+/-), uji katalase, dan uji pewarnaan Endospora. Setelah itu, isolat murni yang diperoleh dengan karakteristik bukan BAL diuji sifat genotipnya (analisis urutan DNA pengkode 16sRNA, amplifikasi DNA pengkode 16sRNA, sekuensing DNA pengkode 16sRNA).

### **Identifikasi Genotif Menggunakan PCR dan Analisis Urutan DNA Pengkode 16S rRNA**

Identifikasi genotif kultur bakteri dilakukan dengan mengekstrak DNA pengkode 16S rRNA yang selanjutnya diamplifikasi dan disekuensing. Isolat yang akan dianalisis tergolong dalam kelompok bakteri Gram negatif (-). Oleh karena itu, ekstraksi DNA menggunakan metode GenAid untuk ekstraksi DNA bakteri Gram negatif (-) dengan *Protocol Geneaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit*. Sel kultur sebanyak  $10^9$  sel/ml disentrifugasi dengan kecepatan 14-16.000 g selama 1 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang. Selanjutnya, pelet ditambahkan 180  $\mu$ l buffer GT dan divortex sesekali. Supernatan ditambahkan 20  $\mu$ l proteinase K, divortex kembali hingga tercampur, dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Setelah inkubasi, supernatan ditambahkan 200  $\mu$ l buffer GB, divortex sesekali, dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Setelah itu, etanol absolut sebanyak 200  $\mu$ l ditambahkan, divortex selama 10 detik, dimasukkan ke dalam kolom GD, dan disentrifugasi dengan kecepatan 14-16000 g selama 2 menit. Penampung kolom GD diganti dengan yang baru. Proses selanjutnya, buffer W1 sebanyak 400  $\mu$ l ditambahkan, disentrifugasi dengan kecepatan 14-16.000 g selama 30 detik, cairan yang terdapat di penampung kolom

GD dibuang. Selanjutnya, sampel ditambahkan buffer W1 sebanyak 600  $\mu$ l, disentrifugasi dengan kecepatan 14-16.000 g selama 30 detik, kolom GD dipindahkan ke eppendorf steril, cairan yang terdapat di penampung kolom GD dibuang kembali. Sentrifugasi dilakukan kembali selama 3 menit untuk mengeringkan kolom GD. Tahap selanjutnya, larutan EB 100  $\mu$ l ditambahkan, dilakukan pemindahan dari kolom GD ke eppendorf baru, lalu disentrifugasi kembali selama 30 detik dengan kecepatan 14-16.000 g. sampel DNA dihasilkan.

### **Amplifikasi DNA Pengkode 16S rRNA dengan PCR**

Reaksi amplifikasi sampel DNA dilakukan dalam 0.2 ml tabung PCR. Setiap tabung reaksi PCR ditambahkan dengan RBC Taq (5 unit/ml) sebanyak 0.25  $\mu$ L, 10 x buffer Taq (mengandung  $Mg^{2+}$ ) sebanyak 5  $\mu$ l, dNTP 2.5 mM sebanyak 4  $\mu$ l. Primer yang digunakan adalah primer universal, yaitu 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan 1387R (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'), masing-masing sebanyak 1.25  $\mu$ l (20 pmol). Ekstrak genom sebanyak 2.5  $\mu$ l (100 ng) dan ditambah ddH<sub>2</sub>O sampai volume menjadi 50  $\mu$ l. Amplifikasi PCR dilakukan pada suhu denaturasi awal 95°C selama 5 menit, penempelan primer pada suhu 94°C selama 30 detik sebanyak 30 siklus, dan perpanjangan pada suhu 50°C selama 1 menit, 72°C selama 2 menit, dan tahap akhir 72°C selama 2 menit. Produk PCR diambil dan disimpan pada suhu 4°C. Selanjutnya, produk PCR (amplifikasi DNA sebanyak 5  $\mu$ l) dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1.5% dan larutan buffer TAE yang terendam dalam tangki. Gel agarosa 1.5% dan larutan buffer TAE terdiri dari 1.5 g serbuk agarosa dan 100 ml buffer TAE dan 8  $\mu$ l ethidium bromide. Elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 100 Volt. Pita



DNA (gel yang terbentuk) diamati di bawah sinar UV.

### Analisis Urutan DNA Pengkode 16S rRNA

Sekuensing DNA pengkode 16S rRNA dilakukan di [Singapura](https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan program BLASTN 2.5.1+, yaitu dengan mencocokkan urutan nukleotida dari hasil sekuensing 16S rRNA dengan data base yang tersedia pada situs [www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi dan Identifikasi Bakteri Indigenus

Hasil penelitian menunjukkan bahwa mikroba indigenus yang terlibat selama proses fermentasi spontan tepung jagung Bisi 16 adalah kapang, khamir, bakteri, dan BAL. Mikroba indigenus dominan dalam fermentasi spontan tepung jagung Bisi 16 adalah BAL, sehingga selama fermentasi terjadi perubahan nilai pH (semakin asam) akibat kadar total asam semakin meningkat seiring dengan interval waktu fermentasi. BAL menghasilkan asam laktat

dan asam organik lainnya sebagai produk metabolit utama. Data identifikasi kapang dan khamir tidak ditampilkan.

Hasil identifikasi sederhana terhadap 6 isolat bakteri indigenus yang telah diisolasi menunjukkan ada dua isolat bakteri non BAL, yaitu isolat ASN9 dan ASN11. Kedua bakteri ini ditemukan terlibat selama proses fermentasi tepung jagung Bisi 16 secara spontan. Hasil identifikasi sederhana isolat disajikan pada Tabel 1.

Kedua isolat termasuk dalam bakteri Gram (-) yang memiliki sifat katalase (+). Kedua isolat ini tidak termasuk dalam golongan BAL, karena BAL termasuk dalam kelompok bakteri Gram (+) dan katalase (-). Isolat ASN9 diperoleh setelah fermentasi spontan tepung jagung Bisi 16 berjalan selama 24 jam, sedangkan isolat ASN11 diperoleh di waktu akhir fermentasi, yaitu 48 jam. Secara tipikal, kedua isolat bakteri ini memiliki kemiripan, yaitu koloni bakteri berwarna putih. Namun, isolat ASN9 memiliki karakteristik tepi permukaan yang agak berlendir (bergetah). Oleh karena itu, kedua isolat ini (ASN9 dan ASN11), dianalisis lebih lanjut karakteristik sifat genotipnya agar diketahui spesies kedua jenis isolat yang ditemukan..

**Tabel 1.** Identifikasi Sederhana Isolat Bakteri Indigenus non BAL dalam Fermentasi Spontan Tepung Jagung

No	Isolat Bakteri	Karakteristik				
		Gram	Katalase	Endospora	Bentuk Sel	Tipikal Koloni
1	ASN3	+	-	-	Batang pendek	Bulat berwarna krem
2	ASN4	+	-	-	Batang	Bulat berwarna krem
3	ASN5	+	-	-	Batang	Bulat, koloni besar berwarna krem
4	ASN9	-	+	-	Batang	Bulat berwarna putih, bagian tepi permukaan berlendir
5	ASN11	-	+	-	Batang	Bulat berwarna

						putih
6	ASN12	+	-	-	Batang pendek	Bulat berwarna krem

### Karakterisasi Genotif Bakteri Indigenus non BAL

Karakterisasi sifat genotif bakteri indigenus non BAL dilakukan menggunakan DNA pengkode 16S rRNA. Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi DNA adalah 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan 1387R (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'). Spesifisitas primer 63F dan 1387R telah diuji secara sistematis dengan berbagai jenis

bakteri dansampel lingkungan, primer ini lebih baik digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA, baik secara ekologi dan studi sistematis dibandingkan amplitude PCR yang lebih umum digunakan (Marchesi *et al.* 1998). Hasil analisis sekuensing *alignment* (pensejajaran) urutan basa DNA pengkode 16S rRNA isolat ASN9 disajikan pada Gambar 1, sedangkan isolat ASN11 dapat dilihat pada Gambar 2.

<i>E. cloacae</i> 11	AGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATG	70
ASN9 1015837	AGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATG	1015896
<i>E. cloacae</i> 71	GAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGG	130
ASN9 1015897	GAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGG	1015956
<i>E. cloacae</i> 131	GGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGT	190
ASN9 1015957	GGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGT	1016016
<i>E. cloacae</i> 191	AACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAA	250
ASN9 1016017	AACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAA	1016076
<i>E. cloacae</i> 251	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC	310
ASN9 1016077	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC	1016136
<i>E. cloacae</i> 311	AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA	370
ASN9 1016137	AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA	1016196
<i>E. cloacae</i> 371	GCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	430
ASN9 1016197	GCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	1016256
<i>E. cloacae</i> 431	ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT	490
ASN9 1016257	ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT	1016316
<i>E. cloacae</i> 491	TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA	550
ASN9 1016317	TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA	1016376
<i>E. cloacae</i> 551	ACCTGGGAACTGCATTGCGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA	610
ASN9 1016377	ACCTGGGAACTGCATTGCGAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA	1016436
<i>E. cloacae</i> 611	GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG	670
ASN9 1016437	GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG	1016496
<i>E. cloacae</i> 671	GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT	730
ASN9 1016497	GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT	1016556
<i>E. cloacae</i> 731	AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAG	790
ASN9 1016557	AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAG	1016616

<i>E. cloacae</i> 791	CTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATT	850
ASN9 1016617	CTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCAAATGAATT	1016676
<i>E. cloacae</i> 851	GACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCT	910
ASN9 1016677	GACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCT	1016736
<i>E. cloacae</i> 911	TACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGTG	970
ASN9 1016737	TACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTGTG	1016796
<i>E. cloacae</i> 971	AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCA	1030
ASN9 1016797	AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCA	1016856
<i>E. cloacae</i> 1031	ACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTAGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGC	1090
ASN9 1016857	ACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTAGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGC	1016916
<i>E. cloacae</i> 1091	CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGG	1150
ASN9 1016917	CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGG	1016976
<i>E. cloacae</i> 1151	GCTACCCACGTGCTACAATGGCGCATACAAAAGAAGCGACCTCCCGAGAGCAAGCGGAC	1210
ASN9 1016977	GCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAC	1017036
<i>E. cloacae</i> 1211	CTCATAAAGTGGGTCTTAATCCGGATTGGAATCTGCAACTCGACTCCCTGAAGTCGGAAT	1270
ASN9 1017037	CTCATAAAGTGGGTCTTAATCCGGATTGGAATCTGCAACTCGACTCCCTGAAGTCGGAAT	1017096
<i>E. cloacae</i> 1271	CCCTTGTAATCCTAAATCAAAATGCTCCGG-GAAAAACCTTCC	1311
ASN9 1017097	CGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCC	1017138

**Gambar 1.** Alignment Urutan Basa DNA Pengkode 16S rRNA Isolat ASN9

Hasil analisis sekuensing isolat ASN9 dan isolat ASN11 menunjukkan terdapat 8 tipe kecocokan urutan basa DNA dengan bakteri *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047, panjang untaian basa DNA kedua isolat sebanyak 5314581. Isolat

ASN9 memiliki kesamaan untai basa DNA dengan *E. cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 maksimal sebesar 2292 bits dan minimal sebesar 2265 bits, sedangkan isolat ASN11 maksimal 2302 bits dan minimal 2274 bits.

<i>E. cloacae</i> 13	AGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATG	72
ASN11 1015837	AGCTTGCTCTCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATG	1015896
<i>E. cloacae</i> 73	GAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGG	132
ASN11 1015897	GAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGG	1015956
<i>E. cloacae</i> 133	GGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGT	192
ASN11 1015957	GGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGT	1016016
<i>E. cloacae</i> 193	AACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAA	252
ASN11 1016017	AACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAA	1016076
<i>E. cloacae</i> 253	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC	312
ASN11 1016077	CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC	1016136
<i>E. cloacae</i> 313	AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA	372
ASN11 1016137	AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCA	1016196
<i>E. cloacae</i> 373	GCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	432
ASN11 1016197	GCGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	1016256
<i>E. cloacae</i> 433	ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT	492
ASN11 1016257	ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT	1016316
<i>E. cloacae</i> 493	TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA	552

ASN11 1016317	TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA	1016376
<i>E. cloacae</i> 553	ACCTGGGAACTGCATTGCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA	612
ASN11 1016377	ACCTGGGAACTGCATTGCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA	1016436
<i>E. cloacae</i> 613	GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG	672
ASN11 1016437	GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG	1016496
<i>E. cloacae</i> 673	GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT	732
ASN11 1016497	GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT	1016556
<i>E. cloacae</i> 733	AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAG	792
ASN11 1016557	AGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAG	1016616
<i>E. cloacae</i> 793	CTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATT	852
ASN11 1016617	CTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATT	1016676
<i>E. cloacae</i> 853	GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT	912
ASN11 1016677	GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT	1016736
<i>E. cloacae</i> 913	TACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTG	972
ASN11 1016737	TACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTG	1016796
<i>E. cloacae</i> 973	AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCA	1032
ASN11 1016797	AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCA	1016856
<i>E. cloacae</i> 1033	ACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGC	1092
ASN11 1016857	ACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGC	1016916
<i>E. cloacae</i> 1093	CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGG	1152
ASN11 1016917	CAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGG	1016976
<i>E. cloacae</i> 1153	GCTACCCACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAAAAGCGACCTCCCGAGAACAAAGCGGAC	1212
ASN11 1016977	GCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAC	1017036
<i>E. cloacae</i> 1213	CTCATAAAGTGCCTCTAATTCCGGATTGGAATCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA	1272
ASN11 1017037	CTCATAAAGTGCCTCTAG-TCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA	1017095
<i>E. cloacae</i> 1273	TCCCTAGTAATCGGAAATCAGAAGGCTCCGG-GAA-ACGT-CCCG	1314
ASN11 1017096	TCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCG	1017140

**Gambar 2.** Alignment Urutan Basa DNA Pengkode 16S rRNA Isolat ASN9

Hasil identifikasi analisis sekuen DNA 16S rRNA menggunakan program BLASTN 2.5.1 + disajikan pada Tabel 2. Identifikasi sekuen untai DNA menunjukkan isolat ASN9 memiliki tingkat kemiripan dengan *E. cloacae subsp. cloacae* ATCC 13047, yaitu 98%, sedangkan isolat ASN11 memiliki tingkat kemiripan 99%.

**Tabel 2.** Hasil Analisis Sekuen DNA 16S rRNA Menggunakan Program BLASTN 2.5.1+

Isolat	Deskripsi (Homolog)	Skor Maksimal	Skor Total	Query Cover	Nilai E	Identifikasi	Kode Akses
ASN9	<i>Enterobacter cloacae subsp. cloacae</i> ATCC 13047 kromosom, genom	2292	18253	95%	0.0	98%	NC 014121.1
ASN11	<i>Enterobacter cloacae subsp. cloacae</i> ATCC 13047 kromosom,	2302	18325	95%	0.0	99%	NC 014121.1

Bakteri *E. cloacae* adalah bakteri Gram (-) dan katalase (+), tergolong dalam *Enterobacteriaceae*. Bakteri *E.*

*cloacae* memiliki peranan hingga tahap akhir waktu fermentasi, yaitu 48 jam. *E. cloacae* adalah bakteri indigenus pada jagung Bisi 16 yang memiliki peranan penting. *E. cloacae* diketahui sebagai salah satu bakteri endofit pada jagung yang berfungsi untuk menunjang pertumbuhan tanaman (Szilagyi-Zecchin *et al.* 2015), karena *Enterobacter*, khususnya *E. cloacae*, memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan kapang patogen dari genus *Fusarium* (Pereira *et al.* 2011), dan berpotensi sebagai inokulan mikroba atau biofertilizer dalam produksi tanaman jagung disebabkan bakteri ini bersifat *biosafety* dan menguntungkan (Thanh and Diep, 2014).

Keterlibatan *E. cloacae* dalam proses fermentasi spontan juga telah dilaporkan pada proses pengolahan produk Kenkey dan Koko, yaitu suatu produk fermentasi spontan berbahan dasar jagung di Ghana (Tamang *et al.* 2016) dan Calugi yang merupakan salah satu produk makanan tradisional di Brazil yang terbuat dari jagung, singkong, dan beras melalui proses fermentasi secara spontan (Miguel *et al.* 2014).

Bakteri *E. cloacae* memiliki ketahanan terhadap asam. Selama fermentasi tepung jagung Bisi 16, nilai pH cairan mengalami perubahan dari 5.88 menjadi 3.97 (akhir fermentasi). Fenomena ini mengindikasikan *E. cloacae* dapat berinteraksi dengan baik dengan BAL (bakteri dominan) selama proses fermentasi spontan tepung jagung Bisi 16. Menurut Pérez-Díaz *et al.* (2013), *E. cloacae* tahan terhadap lingkungan yang asam (pH rendah) dan bergaram tinggi. Selain itu, Assouhou *et al.* (2012), *E. cloacae* resisten terhadap bakteriosin yang dihasilkan oleh beberapa

kultur bakteri asam laktat yang diisolasi selama proses fermentasi doklu (produk tradisional yang dihasilkan dari fermentasi jagung di Afrika).

*E. cloacae* termasuk dalam golongan *Enterobacteriaceae*. Umumnya, golongan bakteri ini memiliki kemampuan menghasilkan enterotoksin (bersifat patogen pada manusia). Oleh karena itu, keamanan bakteri ini perlu dipertimbangkan jika akan dikembangkan sebagai kultur starter dalam modifikasi tepung jagung.

*E. cloacae* yang telah dikembangkan sebagai starter dalam proses pengolahan makanan adalah *E. cloacae* GAO, bakteri ini diisolasi dari cairan fermentasi spontan apel (metode Laomien). Bakteri ini mampu menghasilkan enzim  $\beta$ -galactosidase, enzim yang berperan penting sebagai indikator dalam pengawasan mutu makanan (Nagano *et al.* 1992), meningkatkan produktivitas hidrogen sehingga menghasilkan struktur internal dan rasa produk yang lebih baik (Tamura *et al.* 1995). Menurut Nagano *et al.* (1994), *E. cloacae* GAO dapat diaplikasikan dan aman dimanfaatkan dalam pengolahan produk makanan, karena *E. cloacae* yang diisolasi dari tanaman tidak menghasilkan enterotoksin yang tahan terhadap panas. Nagano *et al.* (1988), *E. cloacae* tidak menyebabkan terjadinya perubahan pertumbuhan organ (hati, ginjal, dan limfa) dan berat pada organ hewan uji, tidak menyebabkan diare, dan tidak meningkatkan respon imun (tidak bersifat infeksi).

Menurut Lokapirnasari *et al.* (2015), bakteri *E. cloacae* WPL 214 menghasilkan enzim selulase (*endoglucanases*, *exoglucanases*, dan  $\beta$ -*glucosidase*). Enzim selulase sangat berperan penting dalam fermentasi tepung jagung, karena enzim ini mampu menguraikan dinding sel pada jagung, sehingga membantu proses

metabolisme mikroba indigenus lain dalam memanfaatkan karbohidrat pada jagung Bisi 16 sebagai sumber energi. Oleh karena itu, potensi *E. cloacae* sebagai starter dalam modifikasi tepung jagung dengan metode fermentasi sangat besar, sehingga kajian lebih dalam mengenai karakteristik produk-produk fermentasi yang dihasilkan oleh *E. cloacae* yang diisolasi dari tepung jagung fermentasi BISI 16 perlu ditingkatkan.

## KESIMPULAN

Fermentasi tepung jagung BISI 16 secara spontan tidak hanya melibatkan BAL, namun juga melibatkan bakteri non BAL, yaitu isolat ASN9 dan ASN11, dengan karakteristik koloni berwarna putih, sel berbentuk batang, Gram (-), katalase (+), dan endospora (-). Sifat genotif berdasarkan analisis sekuensing untaian DNA 16S rRNA menunjukkan kedua isolat memiliki kemiripan homolog dengan *E. cloacae subsp. cloacae* ATCC 13047 yaitu 98% (ASN9) dan 99% (ASN11).

## DAFTAR PUSTAKA

- Alvani, K., X. Qi., R.F Tester (2012). Gelatinisation Properties of Native and Annealed Potato Starches. *Starch - Stärke* 64, 297-303.
- Assohoun MCN, TN Djeni, FK N'Guessan, M Koussemon. 2012. Preliminary study on antimicrobial properties of lactic acid bacteria involved in the fermentation of corn dough during doklu processing in Côte D'Ivoire. *Food*, 6 : 65-70.
- Cui, L., Li, D.-j., Liu, C.-q. (2012). Effect of fermentation on the nutritive value of maize. *International Journal of Food Science & Technology* 47, 755-760.
- Lokapirnasari WP, DS. Nazar, T. Nurhajati, K. Supranianondo, AB. Yulianto. 2015. Production and assay of cellulolytic enzyme activity of *Enterobacter cloacae* WPL 214 isolated from bovine rumen fluid waste of Surabaya abbatoir, Indonesia. *Veterinary World*, Vol. 8 : 367-371.
- Marchesi JR *et al.* 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No 2 : 795-799
- Miguel M.GdCP, CCAdA Santos, MRRM. Santos, WF. Duarte, RF. Schwan. 2014. Bacterial dynamics and chemical changes during the spontaneous production of the fermented porridge (Calugi) from cassava and corn. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 8(9) : 839-849.
- Mohiedeen, I. E., A.H. El Tinay., A.E.O. Elkhaila., E.E. Babiker., L.O. Mallasy. (2010). Effect of fermentation and cooking on protein quality of maize (*Zea mays* L.) cultivars. *International Journal of Food Science & Technology* 45 : 1284-1290.
- Nagano H, M. Omori, Z. Shoji, S. Iibuchi, M. Arai. 1994. Identification and characteristics of microorganisms isolated from traditional wheat flour dough in Thailand. *J. Home Econ. Jpn*, Vol. 45, No. 3 : 219-226.
- Nagano H, M. Omori, Z. Shoji, T. Kawaguchi, M. Arai. 1992. Purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Enterobacter*



- cloacae* GAO. Biosci. Biotech. Biochem, 56 (4) : 674-675.
- Nagano H, S. Kasuya, M. Omori, T. Yano, Z. Shoji. 1988. The safety of leavening bacterium (*Enterobacter cloacae* GAO) in wheat flour food). Agric. Biol. Chem, 52(5) : 1301-1302.
- Pereira P, F. Ibáñez, M. Rosenblueth, M. Etcheverry, E. Martinez-Romero. 2011. Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-independent methods. ISRN Ecology : 1-10.
- Pérez-Díaz *et al.* 2013. Fermented and Acidified Vegetables (Chapter 51) in Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. APHA Press.
- Shrestha, A.K., J. Blazek., B. M. Flanagan., S. Dhital., O. Larroque., M. K. Morel., E. P. Gilbert., M. J. Gidley. 2012. Molecular, mesoscopic and microscopic structure evolution during amylase digestion of maize starch granules. Carbohydrate Polymers 90 : 23-33
- Sukainah A. 2014. Kajian Sifat Fisika Kimia Produk Antara Tepung Jagung dan Potensi Aplikasinya. Disertasi Ilmu Pertanian Konsentrasi Teknologi Pangan, Universitas Hasanuddin
- Szilágyi-Zecchin *et al.* (2015). Potential inoculant strains of Brazilian endophytic bacteria for maize (*Zea mays* L) growth promotion. International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAAR), Vol 7, No. 4 : 128-134.
- Tamang JP, K. Watanabe, WH. Holzapfel. 2016. Review : diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. Front. Microbiol, 7 : 377
- Tamura A, H. Nagano, M. Omori, Z. Shoji, S. Iibushi, M. Arai. 1995. Improvement in hydrogen productivity by a leavening bacterium, *Enterobacter cloacae* GAO, and its application to Mantou. Biosci. Biotech. Biochem, 59 (11) : 2137-2139.
- Thanh DTN, CN Diep. 2014. Isolation, characterization and identification of endophytic bacteria in maize (*Zea mays* L) cultivated on acrisols of the Southeast of Vietnam. American Journal of Life Sciences, 2(4) : 224-233.
- Zeng, J., H. Gao., G. Li., X. Zhao (2011). Characteristics of Corn Flour Fermented by Some *Lactobacillus* Species. In "Computing and Intelligent Systems". Springer Berlin Heidelberg Vol. 233 : 433-441..
- Zhang, X., Q. Tong., W. Zhu., F. Ren (2013). Pasting, rheological properties and gelatinization kinetics of tapioca starch with sucrose or glucose. Journal of Food Engineering 114 : 255-261.